

# 鞣酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

邱龙新, 黄 浩, 陈清西\*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 酪氨酸酶是一种同时具有单酚酶和二酚酶活力的氧化酶. 研究鞣酸对蘑菇酪氨酸酶活力的影响, 结果表明鞣酸对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性都有抑制作用. 鞣酸对单酚酶活力的影响主要表现于它能显著延长酶作用的迟滞时间, 而对稳态活力的影响不大.  $2.0 \mu\text{mol/L}$  鞣酸可以使单酚酶的迟滞时间从  $104.7 \text{ s}$  延长到  $333.6 \text{ s}$ , 增大 2 倍以上, 而酶的稳态活力仅下降  $19.8\%$ . 鞣酸对二酚酶的抑制作用显示浓度效应, 测定导致酶活力下降  $50\%$  的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $65 \mu\text{mol/L}$ . 鞣酸对二酚酶的效应为可逆的竞争性抑制, 抑制常数  $K_i$  为  $36.3 \mu\text{mol/L}$ .

**关键词:** 酪氨酸酶; 鞣酸; 抑制作用; 动力学

**中图分类号:** Q 356.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2005)06-0839-04

酪氨酸酶 (EC. 1. 14. 18. 1) 又称多酚氧化酶, 在动植物体酶促褐变、体内色素合成的过程中起了关键的作用<sup>[1,2]</sup>. 目前国内外已研究了大量的化学物质对酪氨酸酶的抑制作用, 以期寻找高效的抑制剂作为食品加工中的保鲜剂. 鞣酸, 又称单宁酸、单宁, 在茶叶、菠菜中含量丰富, 是一类具有多个游离酚羟基的天然物质, 分子量为  $500 \sim 3\,000$ . 鞣酸和蛋白质及其它生物多聚物形成稳定的交联物, 还可以和重金属、生物碱、糖苷等有机物质反应. 鞣酸主要用于医药和兽药工业, 也应用于酿酒工业中使酒澄清. 作为药品, 它们主要作为收敛剂和止血剂治疗烧伤, 也可应用于口腔和咽喉粘膜的收敛; 它们还被推荐作为解毒剂来解除重金属的毒性. 鞣酸无致突变性<sup>[3]</sup>、有清除氧自由基的作用<sup>[4]</sup>. 目前, 有关鞣酸对酪氨酸酶的效应仅有一篇关于漆树叶虫瘿中的鞣酸对酪氨酸酶抑制作用的报道<sup>[5]</sup>, 但其抑制作用机理的研究还处于空白. 本文以鞣酸为效应物, 研究对蘑菇酪氨酸酶活力的影响, 探讨对酶的抑制作用机理, 以期寻找更有效的酪氨酸酶抑制剂和为该酶抑制剂的分子设计奠定理论依据.

活力为  $6\,680 \text{ U/mg}$ ; 鞣酸 (结构式见图 1) 和二甲亚砜 (DMSO) 均为 Sigma 化学公司产品; L-酪氨酸 (Tyr), L-3,4-二羟基苯氨酸 (DOPA) 为 Aldrich 化学公司产品. 其它试剂为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水.

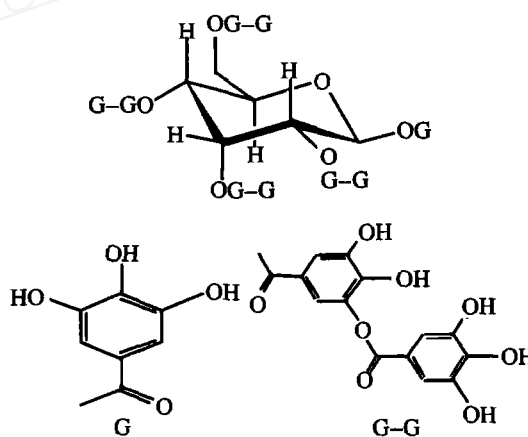


图 1 鞣酸的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of Tannic acid

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

酪氨酸酶为 Sigma 化学公司的蘑菇酪氨酸酶, 比

收稿日期: 2004-11-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30570408), 福建省科技攻关课题 (2004N002), 福建省自然科学基金 (B0410003) 资助

作者简介: 邱龙新 (1969-), 男, 在职硕士研究生. 现工作单位: 龙岩学院.

\*通讯作者: chenqx @jingxian. xmu. edu. cn

### 1.2 方 法

酪氨酸酶的酶活力测定<sup>[6]</sup>: 先加入  $0.1 \text{ mL}$  含不同浓度的鞣酸 (溶于 DMSO 溶液) 于比色杯中, 再加进  $2.8 \text{ mL}$  预先在  $30^\circ\text{C}$  恒温水浴保温的底物溶液, 然后加入  $0.1 \text{ mL}$  酪氨酸酶水溶液, 即刻充分混匀, 在  $30^\circ\text{C}$  恒温条件下测定波长为  $475 \text{ nm}$  的光密度值, 由其随时间的增长直线的斜率计算出酶的活力. 测定单酚酶活力所用的底物为  $2.0 \text{ mmol/L Tyr}$ , 酶的终浓度为  $33.3 \mu\text{g/mL}$ . 二酚酶所用底物为  $0.5 \text{ mmol/L DOPA}$ , 酶的终浓度为  $6.67 \mu\text{g/mL}$ , 所用 DMSO 终浓度均为  $3.33\%$ . 测定仪器为 UV-650 分光光度计. 鞣酸对酶抑

制作用的机理是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化反应的动力学参数, 包括表观米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_m$ ) 的变化来判断的。

## 2 实验结果

### 2.1 鞣酸对蘑菇酪氨酸酶催化 Tyr 氧化反应的影响

蘑菇酪氨酸酶具有单酚酶和二酚酶的活性, 本文以酪氨酸 (Tyr) 为底物分析测定该酶的单酚酶活性, 在含不同浓度鞣酸为效应物的测活体系中, 测定酶促反应的进行曲线, 结果见图 2。曲线 1 为该酶在不含鞣酸的测活体系中单酚酶的作用进行曲线, 显示产物的形成量在开始时是缓慢地上升, 到一定时间后成直线上升, 反应体系达到恒定的斜率, 说明反应达到稳态。直线部分的斜率为该酶的稳定态活力, 直线部分外延交于 X 轴的截距为酶促反应的迟滞时间。曲线 2~6 分别为酶在含 0.5、0.75、1.0、1.5 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鞣酸的测活体系中的反应进行曲线。显示该酶反应的迟滞时间随着抑制剂浓度的增大而延长, 稳态的酶活力也随着抑制剂浓度的增大而有所下降, 说明鞣酸对蘑菇酪氨酸酶单酚酶的活性具有一定的抑制作用, 其主要作用是延长酶反应的迟滞时间。

分别以稳态活力和迟滞时间对鞣酸浓度作图, 结果见图 3。显示鞣酸对酪氨酸酶单酚酶活力的影响主要表现在对迟滞时间的影响, 酶反应的迟滞时间随着抑制剂浓度的增大而呈直线上升, 无鞣酸存在时的迟滞时间为 104.7 s, 2  $\mu\text{mol/L}$  的鞣酸可以使酶促的迟滞时间延长至 333.6 s, 增大了 2 倍以上。而稳态的酶活力则随着抑制剂浓度的增大而缓慢地下降, 2  $\mu\text{mol/L}$

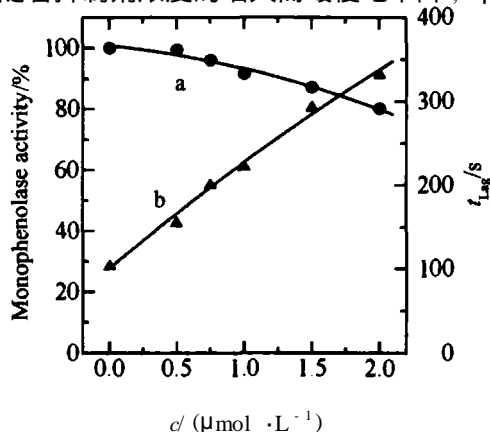


图 3 鞣酸对酪氨酸酶单酚酶的稳态活力 (a) 和迟滞时间 (b) 的影响。

Fig. 3 Effects of tannic acid on the steady-state rate (a) and lag time (b) of monophenolase of mushroom tyrosinase

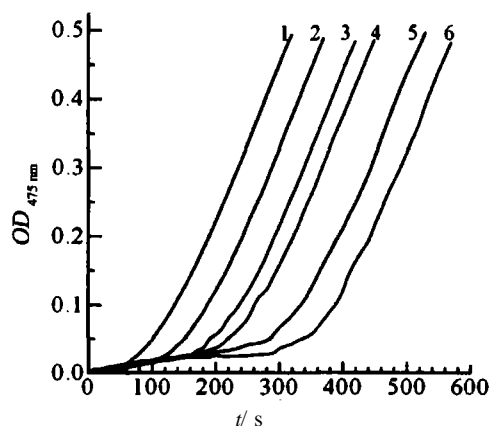


图 2 鞣酸对酪氨酸酶单酚酶抑制作用的进程曲线  
曲线 1~6 鞣酸的浓度分别为: 0、0.5、0.75、1.0、1.5 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 2 Progress curves of monophenolase of mushroom tyrosinase inhibited by tannic acid

L 的鞣酸仅使酶的稳态活力下降 20 %。

### 2.2 鞣酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力的影响

以 L-DOPA 为底物, 测定酶的二酚酶活性。酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化的反应曲线为通过原点的直线, 不存在迟滞过程。有鞣酸存在下, 直线的斜率随着鞣酸的浓度增大而下降, 说明鞣酸对酪氨酸酶的二酚酶活力有抑制作用。图 4 为鞣酸对酪氨酸酶的二酚酶活力的抑制曲线, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力呈指数的下降。鞣酸浓度在 100  $\mu\text{mol/L}$  内, 二酚酶活力下降较为显著, 达 60 %。鞣酸浓度在 100 ~ 500  $\mu\text{mol/L}$ , 酶活力下降较缓慢, 仅下降 14 % 左右。测定导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 65  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.3 鞣酸对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用表现为可逆效应

在测活体系中, 固定底物 (L-DOPA) 浓度为 0.5

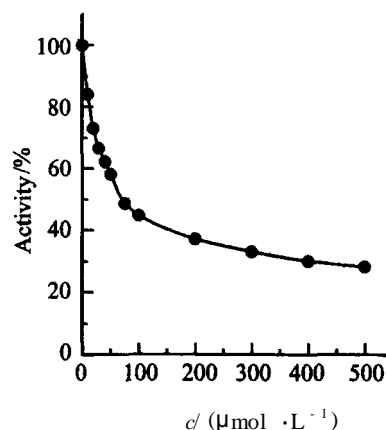


图 4 鞣酸对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Fig. 4 Effect of tannic acid on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

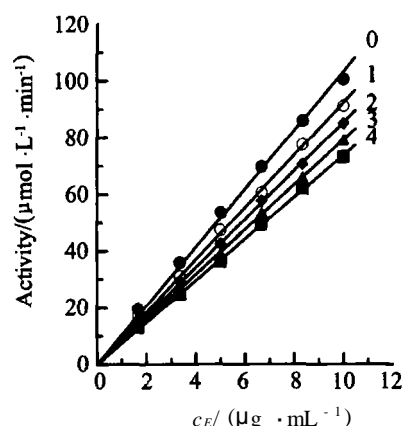


图 5 鞣酸对酪氨酸酶抑制机理的判断

直线 0 ~ 4 鞣酸浓度分别为: 0、5、10、15 和 20  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 5 Inhibitory mechanism of tannic acid on mushroom tyrosinase

$\text{mmol/L}$ , 加入不同浓度的鞣酸, 改变加入的酶量, 测定酶催化 L-DOPA 氧化的活力. 图 5 表示酶在含鞣酸的测活体系中酶的剩余活力与加入的酶量的关系, 酶活力对酶量作图为一组通过原点的直线, 随着鞣酸浓度的增大, 直线的斜率降低. 说明鞣酸对酶的抑制作用属于可逆过程, 鞣酸是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降.

## 2.4 鞣酸对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型及抑制常数的测定

在含不同浓度鞣酸的测活体系中, 测定酶催化不同浓度的 L-DOPA 氧化反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图 (图 6), 得到一组纵轴截距不变的直线, 说明鞣酸作为酪氨酸酶抑制剂, 不影响最大反应速度 ( $V_m$ ), 只使米氏常数 ( $K_m$ ) 增大, 其抑制效应为竞争性类型. 这可能是由于它的组成中含有的没食子酸与底物的分子结构类似, 因而它可以竞争酶活性中心的结合部位. 鞣酸只能与游离酶 (E) 结合而导致酶活力的下降, 但不能与酶-底物络合物 (ES) 结合, 它与酶结合产生的对酶的抑制作用会随着底物用量的增加而减弱直至被消除. 以不同浓度鞣酸下测定的  $1/K_m$  对抑制剂浓度作图 (图 6 内插图) 为一条直线, 从直线的斜率可以求得抑制常数 ( $K_i$ ) 为  $36.3 \mu\text{mol/L}$ .

## 3 讨论

酪氨酸酶在催化反应过程中存在 3 种形式的酶<sup>[7]</sup>, 即: 还原型、氧化型和脱氧型. 还原型酶只有二酚酶活性, 氧化型酶具有单酚酶和二酚酶活性, 它们作用

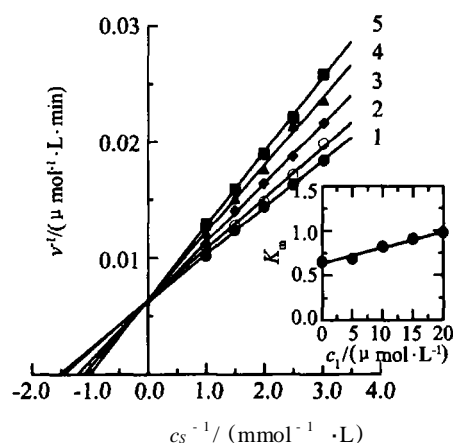


图 6 鞣酸对酪氨酸酶抑制类型和抑制常数的测定

直线 1 ~ 5 鞣酸浓度分别为: 0、5、10、15 和 20  $\mu\text{mol/L}$

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase inhibited by tannic acid. The inset shows the plot of apparent  $K_m$  versus the concentration of tannic acid

底物和被还原成脱氧型, 脱氧型酶能够结合一分子氧回到氧化型状态, 完成一个循环. 还原型酶与单酚结合产生中间络合物不能进一步分解产生产物, 因此, 以单酚为底物的酶促反应的动力学特征表现有个迟滞时间, 而以二酚 DOPA 为底物就没有迟滞期的现象, 可以迅速达到稳定态. 本文以 Tyr 为底物, 研究鞣酸对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶活力的影响, 发现酶促反应的迟滞时间延长十分明显, 只要  $2 \mu\text{mol/L}$  的鞣酸就可以使单酚酶的迟滞时间延长 2 倍以上, 而稳定态的酶活力仅下降 20%. 显示鞣酸对单酚酶的效应较对二酚酶的效应强烈,  $2 \mu\text{mol/L}$  的鞣酸仅使二酚酶活力下降 2.5%, 要使二酚酶活力下降 20% 需要鞣酸浓度为  $15 \mu\text{mol/L}$ . 本文系统研究鞣酸对二酚酶的抑制作用动力学, 结果表明, 鞣酸对二酚酶活力的抑制作用为竞争性可逆机理. 测定它的  $IC_{50}$  为  $65 \mu\text{mol/L}$ , 抑制常数 ( $K_i$ ) 为  $36.3 \mu\text{mol/L}$ . 鞣酸分子含有几个没食子酸结构 (图 1). 有文献报道<sup>[8]</sup> 没食子酸和十二烷基没食子酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶都有抑制效应, 其  $IC_{50}$  分别为  $4.5 \text{ mmol/L}$  和  $1.5 \text{ mmol/L}$ , 而我们的结果鞣酸的  $IC_{50}$  为  $65 \mu\text{mol/L}$ , 分别是没食子酸的  $1/70$  和十二烷基没食子酸的  $1/23$ . 这说明鞣酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制效应比没食子酸和十二烷基没食子酸强很多. 鞣酸对蘑菇酪氨酸酶二酚酶的抑制为竞争性抑制, 提示其主要是与底物竞争酶活性中心的铜离子, 因为鞣酸分子中含有较多没食子酸的多酚基成分, 与多巴的分子结构相似, 它们相互竞争和酶结合, 导致酶活力的下降. 与没食子酸一样, 鞣酸也具有较弱的还原性, 这可

能也是鞣酸抑制酪氨酸酶活性的原因之一. 体外实验表明,鞣酸可被酶解或酸解生成相对无毒的没食子酸. 因此,本研究结果表明,如果对鞣酸进行分子改造,去除低微的毒性,鞣酸将是一种较为高效的酪氨酸酶抑制剂,有可能作为食品保护剂,防止食品褐变.

### 参考文献:

- [1] 赵会全,刘望夷. 酪氨酸酶的分子生物学研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册,1999,13(6):273-292.
- [2] 刘晓丹,黄璜,陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2003,42(1):102-106.
- [3] Ssu ching C, King thom C. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds[J]. Food and Chemical Toxicology,2000,38:1-5.
- [4] 罗广华,王爱国. 植物中的多酚物质对超氧化物自由基的清除作用[J]. 热带亚热带植物学报,1994,2(4):95-99.
- [5] Kubo I, Kinst Hori I, Nihei K, et al. Tyrosinase inhibitors from galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences,2003,58(9-10):719-725.
- [6] 黄璜,刘晓丹,陈清西. 苯甲醛族化合物对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2003,42(1):98-101.
- [7] Chen Q X, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003,18(6):491-496.
- [8] Kubo I, Chen Q X, Nihei K. Molecular design of anti-browning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors [J]. Food Chemistry, 2003,81:241-247.

## The Inhibitory Effect on Mushroom Tyrosinase by Tannic Acid

QIU Long-xin, HUANG Hao, CHEN Qing-xi \*

(Key Lab. of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,  
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Tyrosinase (1.14.18.1) is an enzyme that has both monophenolase activity and diphenolase activity. In this paper, tannic acid was discovered to inhibit both the monophenolase activity and the  $\sigma$  diphenolase activity. The major effect of tannic acid on monophenolase activity is on the lag time of the enzyme for oxidation of L-tyrosine, which was lengthened obviously while the steady-state rate of monophenolase decreased slightly with the increase of concentration of tannic acid. 2  $\mu\text{mol/L}$  of tannic acid resulted in the lag time extension from 104.7 s to 333.6 s, and only 19.8 % of the steady-state rate of monophenolase could be observed. The inhibition kinetics and mechanism of tannic acid on the diphenolase activity of the enzyme has been studied. The results show that the inhibition of tannic acid is a reversible reaction with remaining enzyme activity. The  $IC_{50}$ , inhibitor's concentration leading to 50 % activity lost, is estimated to be 65  $\mu\text{mol/L}$ . The inhibition kinetics analyzed by Lineweaver-burk plots shows that tannic acid is a competitive inhibitor for the oxidation of L-DOPA, and its inhibition constant is 36.3  $\mu\text{mol/L}$ .

**Key words:** tyrosinase; tannic acid; inhibition; kinetics